

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

553836

(43) 国際公開日
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

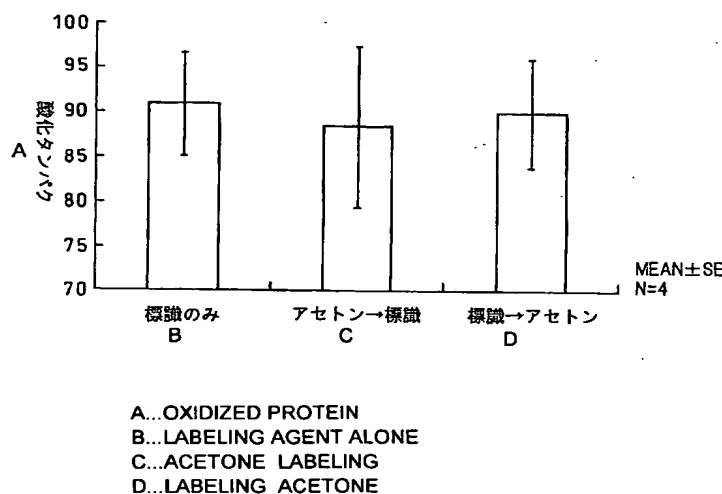
(10) 国際公開番号
WO 2004/095022 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/50, 21/64 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005620 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤田 宏志 (FUJITA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP). 平尾 哲二 (HIRAO, Tetsuji) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP).
(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 20 日 (20.04.2004)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2003-116157 2003 年 4 月 21 日 (21.04.2003) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1048010 東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号 Tokyo (JP).
(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF EVALUATING OXIDIZED PROTEIN IN HORNY CELL LAYER

(54) 発明の名称: 角層における酸化タンパク質の評価方法



(57) Abstract: It is intended to provide a method of two-dimensionally evaluating the properties of an oxidized horny cell layer protein on the horny cell layer which comprises specifically fluorescent-labeling carbonyl groups in the oxidized protein in a horny cell layer sample collected from the skin and then detecting the fluorescence to thereby conduct the evaluation; a kit to be used for carrying out the method; and a method of screening a drug inhibiting an increase in the oxidized protein. Further, it is intended to provide a method of detecting the oxidation state of cornified cell envelopes (thickened horny cell films), i.e. water-insoluble matters contained in a horny cell layer sample originating in the skin, which comprises specifically fluorescent-labeling carbonyl groups in the oxidized cornified envelopes and detecting the fluorescence to thereby conduct the evaluation.

(57) 要約: 本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行う方法、及びその方法を実施するために利用されるキット、

[続葉有]

WO 2004/095022 A1



ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤のスクリーニング方法を提供する。更に、皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行う方法も提供する。

明 細 書

角層における酸化タンパク質の評価方法

技術分野

本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、酸化タンパク質を特異的に蛍光標識することの特徴とする方法、及びその方法を実施するために利用されるキットを提供する。本発明はまた、酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウムなどによる酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤のスクリーニング方法を提供する。本発明は更に、皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープの酸化形態を検出する方法にも関連する。

背景技術

肌質（または皮膚の状態）を的確に把握することは、より健康な皮膚を維持するための的確なスキンケアをする上で重要である。そのため、化粧品によるスキンケアを実施するに際し、例えば、美容技術者による問診などを通じて、化粧品の使用者の肌質が評価されてきた。また、肌質の客観的な評価を目的として、各種の計測機器を使用して、観察又は測定されるパラメーターにより、皮膚の状態または機能を評価することも行われている。

近年、皮膚の加齢に伴う老化や光老化との関係で、角層酸化タンパク質の研究が盛んに行われている。酸化タンパク質とは、酸化を受けた結果カルボニル基の導入されたタンパク質をいい、一般に、タンパク質におけるLys、Arg、Proといったアミノ酸残基のNH₂基が直接酸化されてカルボニル基となった結果生成されたものと、脂質

が酸化して過酸化脂質、更には分解して反応性の高いアルデヒドとなり、それがタンパク質と結合することで生成されたものがある。酸化タンパク質は老化関連での研究が豊富にされており、加齢（脳、肝、線維芽細胞）、アルツハイマー病、早老症（Werner症候群）等において増加することが認められている。

皮膚においては、皮膚表面の皮脂がフリーラジカルによって酸化し、過酸化脂質が生成することでタンパク質の酸化は開始されるものと考えられる。いったん過酸化脂質が生成されると、酸化は連鎖的に進行し、肌表面に刺激を与えるだけにとどまらず、角質層の奥まで入り込んで細胞にダメージを与える。このようにして、皮脂、皮膚タンパク質の酸化は肌本来がもつうるおい、はり、明るさ等を保つ機能をことごとく低下させると考えられる。従って、表皮の酸化タンパク質の性状、例えば存在量、分布状態等を評価することは、肌質または皮膚の状態を的確に把握し、その後のスキンケアの方針決定や化粧品の選定のために極めて重要であるものと考えられる。

前述の通り、角層酸化タンパク質に関する研究が多々行われている。J.J.Thiele et al. FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406には、角層酸化タンパク質の検出方法が記載されている。それには、粘着テープを皮膚表層に貼付け、剥がすといったいわゆるテープストリッピング操作を行うことで角層の付着したテープ（「テープ角層」）を獲得し、酸化タンパク質をELISAにて検出する方法が開示されている。Thieleらによれば、テープ角層に紫外線照射を施したところ、酸化タンパク質の増加が認められ、また酸化タンパク質の存在量は、上腕等の非露光部角層よりも顔面等の露光部角層において多い、とのことである。

J.J.Thiele et al. J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3),

335-359においては、テープ角層からタンパク質抽出を行い、可溶性成分をDNPH標識し、SDS-PAGEにかけ、抗DNP抗体を用いてウェスタンブロットを行うことで酸化タンパク質の検出を行っている。それにおいては、酸化タンパク質は角層の中層や下層よりも上層において多く存在することが報告されている。

C. S. Sander et al. J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625においては、ヒト皮膚組織切片をDNPHで標識し、抗DNPで染色することで酸化タンパク質の検出を行っている。それにおいては、光老化皮膚では主に真皮において酸化タンパク質の量が増大することが認められ、また、紫外線を連日照射することで角層酸化タンパク質の量が増加し、またその増加の割合は紫外線の照射量に依存して増大することが報告されている。

このように、角層酸化タンパク質に関する研究は盛んに行われ、皮膚の加齢による老化、紫外線照射などによる光老化との関連性も示唆されている。従って、皮膚の酸化タンパク質の性状の評価は、皮膚老化の予防又は改善を目的とする適切なスキンケア法、治療法、化粧品、医薬品の選定などのために有効な情報を提供するものと予想される。

従来技術における酸化タンパク質の検出はいずれも角層試料を採取し、タンパク質抽出に付し、そのタンパク質抽出物にDNPHを作用させて酸化タンパク質をDNPで標識し、SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗DNP抗体を作用させてからパーオキシダーゼ標識二次抗体を結合させ、そしてケミルミネッセンス試薬（ECL基質）で発色させるといった手間暇のかかる工程を包含するものであった。しかも、得られる情報は酸化タンパク質の量に関するものに限られ、それが肌上でどのように分布し、顕在化しているかといった二次元的な詳細な情報は一切提供しないものであった。従っ

て、酸化タンパク質の検出は肌質の評価に有用であると示唆されているにもかかわらず、その操作が面倒であり、また得られる情報も限られる、などといった理由であまり活用されるものではなかった。しかしながら、その簡易化が図られ、またその情報内容もより詳細なものとなれば、例えば近年における化粧品業界などで行われている適切なスキンケア法などのアドバイスを目的とするカウンセリングサービスの提供のための有力な手段ともなり得るものと考えられる。

発明の開示

本発明者は、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を簡易に獲得し、特に化粧品等の販売の際のカウンセリングサービスにおけるかかる酸化タンパク質の情報の活用を図ることを可能とすることを課題とする。従来において、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を獲得しようとする試みは全くもってなされてきていなかった。

従って、本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法を提供する。好ましくは、前記検出は蛍光顕微鏡下で行われる。更に好ましくは、前記蛍光顕微鏡により得た検出結果は画像化される。

好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセインー５－チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる。

別の好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

別の好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、しかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

好ましくは、前記角層試料は皮膚に対するテープストリッピングにより採取されたテープ角層である。

本発明は更に、角層酸化タンパク質の角層上での存在を二次元的に評価する方法に利用するためのキットであって、

テープストリッピングにより角層試料を採取するための粘着テープ；及び

酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識するための蛍光物質；

を含んで成ることを特徴とするキットを提供する。好ましくは、前記評価は蛍光顕微鏡下で行われる。更に好ましくは、前記蛍光顕微鏡により得た検出結果は画像化される。

好適な態様において、前記蛍光物質はヒドラジノ基含有蛍光物質であり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッ

ドヒドラジドから成る群から選ばれる。

別の好適な態様において、前記蛍光物質は蛍光標識アビジンであり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

別の好適な態様において、前記蛍光物質は蛍光標識抗体であり、前記酸化タンパク質の蛍光物質による特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、しかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

別の観点において、本発明は酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤のスクリーニング方法を提供する。この方法は、角層、例えば皮膚から採取した角層試料又は皮膚そのものを適当な酸化剤及び候補薬剤で処理し、しかる後に角層上の酸化されたタンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで、当該薬剤の酸化タンパク質の増加を抑制する活性を評価することを特徴とする。

好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる。

別の好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の

特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

別の好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、しかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

好ましくは、前記角層試料は皮膚に対するテープストリッピングにより採取されたテープ角層である。

本発明は更に、皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法を提供する。

好適な態様において、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる。

別の好適な態様において、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチン

ヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

別の好適な態様において、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、しかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

更に好ましくは、前記方法は、前記コーニファイドエンベロープの疎水性領域を選択的に染色できる色素で染色して検出する及び／又は当該コーニファイドエンベロープの抗原性を検出することを含んで成る。好ましくは、前記色素はナイルレッドであり、前記抗原性は抗ヒトインボルクリン抗体を使用して検出される。

更に好ましくは、前記検出は蛍光顕微鏡で行われる。

図面の簡単な説明

図 1 はビオチンヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出結果を示す。

図 2 はテキサスレッドヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出結果を示す。

図 3 はジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) による角層酸化タンパク質の検出結果を示す。

図 4 はアセトン処理した角層の酸化タンパク質の評価結果を示す。

図 5 はフルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる角層酸化タンパク質の部位差検出結果を示す。

図 6 は角層最外層と内層での酸化タンパク質の比較結果を示す。

図 7 は紫外線照射による角層酸化タンパク質の増加結果を示す。

図 8 は紫外線照射による角層酸化タンパク質の増加結果を示す。

図 9 は次亜塩素酸ナトリウムと不飽和脂肪酸による角層酸化タンパク質の増加結果を示す。

図 10 は次亜塩素酸ナトリウムによる角層酸化タンパク質の増加結果を示す。

図 11 は不飽和脂肪酸による角層酸化タンパク質の増加結果を示す。

図 12 はアルデヒドによる角層酸化タンパク質の増加結果を示す。

図 13 はビオチンヒドラジドによる酸化コーニファイドエンベロープの検出結果を示す。

図 14 はコーニファイドエンベロープの酸化度と抗インボクリン抗体を利用して検出した成熟度との同時比較結果を示す。

図 15 はコーニファイドエンベロープの酸化度とナイルレッドを利用して検出した成熟度との同時比較結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法及びその方法を実施するためのキットを提供する。本発明の方法に従えば、以降の実施例にも示す通り、酸化タンパク質の特異的な蛍光標識が可能となる。

角層は表皮角化細胞が終末分化して形成された角質細胞と、それを取りまく細胞間脂質から構成される。角質細胞は構造タンパク質

たるケラチンを主成分とし、それを包むコーニファイドエンベロープ（「角質肥厚膜」）から構成される。角層タンパク質は紫外光、化学系酸化剤、大気汚染物質などの様々な因子に対する暴露や加齢に伴い、酸化を受けた結果カルボニル基が導入される。このような酸化には、タンパク質におけるLys、Arg、Proといったアミノ酸残基のNH₂基が直接酸化されてカルボニル基となる場合と、脂質が酸化して過酸化脂質、更には分解して反応性の高いアルデヒドとなり、それがタンパク質と結合することで起こる場合とが考えられる。

本発明において、皮膚由来の角層試料は、身体のいずれの部分に由来する試料でもよく、また、かような試料（組織もしくは細胞）の培養物であってもよい。該試料の由来する身体の部位または領域の典型例としては、顔面の頬、額、手甲および体幹などを挙げることができる。

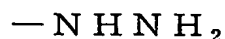
このような試料は、所謂、外科的手段等の侵襲的な方法により取得されたものであってもよいが、殊に肌質の評価を目的とする場合には、簡易さを理由に、非侵襲的な方法により皮膚から取得されるものであることが好ましい。非侵襲的な方法としては、当該技術分野で常用されているテープストリッピングや擦過法等を挙げることができる。

テープストリッピングは、皮膚表層に粘着テープ片を貼付、剥がすことを実施することで、皮膚の二次元的状態をその粘着テープにそのまま転写させることができるため、本発明において特に好ましい。テープストリッピングによりテープ角層を採取し、裁断せずにそのままの状態では酸化タンパク質を特異的に蛍光染色すれば、実際の皮膚の二次元的性状に対応した酸化タンパク質の二次元的情報が得られることとなる。

テープストリッピングの好ましい方法は、まず皮膚の表層を例え

ばエタノールなどで浄化して皮脂、汚れ等を取り除き、適当なサイズ（例えば5×5cm）に切った粘着テープ片を皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付け、その後均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることで行われる。粘着テープは市販のセロファンテープなどであってよく、例えばScotch Superstrength Mailing Tape（3M社製）等が使用できる。

本発明において利用できる酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識する蛍光物質は、酸化タンパク質のカルボニル基に結合できるヒドラジノ基



を有するものが好ましい。そのような蛍光物質の例には、フルオレセインー5ーチオセミカルバジド、テキサスレッドヒドラジド、ルシファーイエローヒドラシド等が挙げられる。

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1)角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2)これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のヒドラジノ基含有蛍光物質を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3)反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；
- (4)任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、ビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの組合わせを用いることもできる。ビオチンヒドラジドもヒドラジノ基を有するため、タンパク質のカルボニル基に

結合できる。この場合、まず酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを結合させ、しかる後に蛍光標識アビジンをビオチン-アビジン結合を介してビオチンヒドラジドに結合させ、その結果酸化タンパク質は蛍光標識される。ビオチンヒドラジドは当業界においてよく知られ、例えばピアース社から製造販売されているものを使用することができる。また、蛍光アビジンは、例えばフルオレセインアビジンなどが使用できる。

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1)角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2)これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のビオチンヒドラジドを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3)反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、蛍光標識アビジンを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (4)蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；
- (5)任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、酸化タンパク質のカルボニル基にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、そのジニトロフェニル部分を蛍光色素で標識することで行うこともできる。従って、本発明の更なる好適な態様では、酸化タンパク質のカルボニル基に結合させたジニトロフェニルヒドラジンのジニトロフェニル部分を蛍光免疫測定法等で検出することができる。

このようなジニトロフェニルヒドラジンを利用して蛍光標識する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる

：

(1)角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する

；

(2)これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）中のジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(3)反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、抗DNP抗体、例えばウサギDNP抗体（ZYMED社製）の同生理溶液を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(4)反応終了後に同生理溶液にて十分に洗浄し、上記抗DNP抗体に特異的な蛍光標識抗二次抗体、例えばフルオレセイン標識抗ウサギIg（アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(5)蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；

(6)任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

本発明に係るキットは、上述の粘着テープ及び蛍光物質の他に、上述の各種評価方法の実施に必要な試薬、例えば各種緩衝剤も一緒に含んでよい。

上記の酸化タンパク質の検出方法及びキットを使用することで、酸化タンパク質の皮膚上での二次元的性状、詳しくは存在量、存在箇所、分布状態、例えば散在しているか、局在しているか、等の様々な情報を得ることができ、しかもそれは従来必要とされていたタンパク質の抽出操作、電気泳動操作、ウェスタンブロッティング操作などを必要とせず、高価な機器として蛍光顕微鏡さえあれば実施可能となる。従って、上記の酸化タンパク質の検出方法及びキットは、肌質の評価にとって有力な情報を簡単な操作及び設備で実施で

きるものとし、例えば化粧品販売の店頭でも簡単に実施することが可能である。

本発明は酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤のスクリーニング方法も提供する。この方法は、角層、例えば皮膚から採取した角層試料又は皮膚そのものを適当な酸化剤及び候補薬剤で処理し、しかる後に角層上の酸化されたタンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで、当該薬剤の酸化タンパク質の増加を抑制する活性を評価することを特徴とする。酸化剤としては、当業者に周知の様々な酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウム、不飽和脂肪酸、例えばリノール酸、オレイン酸、パルミトレイン酸、アルデヒド類、例えばアクロレイン等を使用してよい。角層試料の酸化剤による処理は、候補薬剤による処理と同時に行うか、又は候補薬剤による処理の後に行ってよい。好ましい態様において、角層試料を酸化剤及び候補薬剤で同時に処理する。

酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤のスクリーニング方法は具体的には、例えば下記のとおりにして実施することができる。

健常人の皮膚、例えば非露光部位たる腹部に粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取する。角層の付着したテープを、酸化剤と一定濃度の候補薬剤が混合した水溶液中でインキュベートする。インキュベート終了後に十分に洗浄した後、酸化されたタンパク質のカルボニル基を上記のとおり特異的に蛍光標識し、十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡などにて観察することで、候補薬剤が、酸化剤による酸化タンパク質の増加をどの程度抑制するかを評価する。評価は、例えば酸化剤のみでインキュベートした時の値と水のみでインキュベートした時の値の中間値まで酸化タンパクの増加を抑制する薬剤の濃度を基準に選定してよく、例えばその濃度が 1 mM 以下、好ましくは 500 μ M 以下、より好ましくは 2

50 μ M以下の場合、酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤とすることができる。また、酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤の効果は、ヒト皮膚へ酸化剤と同時に塗布した後に採取した角層試料の酸化タンパク質の値に基づき評価することもできる。

更に、本発明は皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープ、詳しく酸化形態のコーニファイドエンベロープ中の酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法を提供する。

上述した通り、角質細胞は、ケラチン線維を主成分とし、それを包むコーニファイドエンベロープから構成される。コーニファイドエンベロープは、表皮角化細胞が分化するにしたがって産生される複数のコーニファイドエンベロープ前駆体タンパクが、酵素トランスグルタミナーゼにより架橋され不溶化して形成されるものである。さらに、その一部には、セラミドなどが共有結合し、疎水的な構造をとることで、前述した細胞間脂質のラメラ構造の土台を供給し角層バリアー機能の基礎を形成することが示唆されている。コーニファイドエンベロープは、皮膚組織または培養皮膚細胞などを、ドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤およびメルカプトエタノールなどの還元剤を含む溶液中で煮沸し、遠心分離などの手段により可溶性成分を除去した不溶性画分を得ることにより調製できる。これを顕微鏡で形態観察することにより、その性状を評価することができる。Michel らは、角層の最外層に比較して角層の深部においては、脆弱な構造のコーニファイドエンベロープが多いことを報告している（J. Invest. Dermatol 91: 11-15, 1988）。一方、乾癬や葉状魚鱗癬などでは最外層においても脆弱なコーニファイドエン

ベロープが認められるとしている (Br. J. Dermatol. 122 : 15-21、1990)。

角層バリアー機能、殊に、体内からの水分の蒸散や外界からの異物の混入を防ぐ機能の主体をなすと考えられている脂質とコーニファイドエンベロープとの関連性、あるいはコーニファイドエンベロープの性状が注目され、その評価方法も開示されている (特開2001-91514号公報)。しかしながら、従来技術において、コーニファイドエンベロープの酸化形態の評価に関する報告はされていなかった。上述の通りコーニファイドエンベロープもタンパク質から構成されるため、本発明に係る角層酸化タンパク質の検出方法を適用することにより、その酸化形態が同様に検出できた。

コーニファイドエンベロープの酸化形態の具体的な評価方法は、例えば以下のようにして実施できる：

- (1)角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2)これに適当な緩衝液 (例えば100mMのMES-Na緩衝液 (pH5.5)) 中のビオチンヒドラジドを室温にて数時間 (例えば1時間) 反応させる；
- (3)反応終了後に、水不溶性画分たるコーニファイドエンベロープを、水性抽出液 (例えば2%のドデシル硫酸ナトリウム、20mMのジチオスレイトール、5mMのEDTAを含む0.1Mのトリス塩酸塩緩衝液 (pH8.5)) を加えて加熱処理し (例えば100℃にて10分)、不溶物を遠心分離 (例えば4,000g、10分間) して、コーニファイドエンベロープとして集める；
- (4)(3)の操作を任意に繰り返して、可溶性成分を徹底的に除去する；
- (5)コーニファイドエンベロープ浮遊液をスライドガラスに滴下

し、風乾、アセトン固定の後、適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄し、次に蛍光標識アビジンを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(6)反応終了後に同生理溶液で十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて酸化コーニファイドエンベロープを検出する；

(7)任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

上記酸化コーニファイドエンベロープの検出方法において、任意的に、コーニファイドエンベロープ成熟形態を評価するため、疎水性領域を選択的に染色する色素による染色を行ったり、またコーニファイドエンベロープ未熟形態を評価するため、インボルクリン抗体に対する抗原性の検出を併せて実施してもよい。

疎水性領域（特に、生物組織における）を選択的に染色できる色素としては、各種疎水性領域の染色に使用されているものが使用することができる。このような色素の具体的なものとしては、ナイルレッド（Nile Red）、オイルレッドO（Oil Red O）、スダンIII（Sudan III）を挙げることができる。特にナイルレッドを好適に使用することができる。ナイルレッドは、その還元型であるナイルブルーとの混合物であってもよい。このような混合物には、ナイルブルーの水溶液中でナイルブルーの一部が自然に酸化されてナイルレッドに転化している状態のものも包含される。

コーニファイドエンベロープの構成タンパク質の抗原性を検出するための対象となるタンパク質としては、インボルクリン、ロリクリンなどの脂質が共有結合しうるタンパク質やタンパク質間の架橋結合であるイソペプチド、シュウドイソペプチドを挙げることができる。これらの抗原性は、これらのタンパク質またはペプチドに対する抗体を使用して検出することができる。検出方法は、上記タンパク質またはペプチドへの抗体の結合を検出できる方法であれば、

いかなる方法であってもよいが、組織標本中の酵素、構造タンパク質などの抗原物質を標識または染色するのに使用されている蛍光抗体法が好適である。抗体の蛍光標識としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（T R I T C）などを使用するのがよい。

コーニファイドエンベロープの性状の評価方法によれば、例えば、抗原性の検出方法により角層試料におけるコーニファイドエンベロープのインボルクリンが有意に検出できる場合は、有意量（または識別可能な程度）までには、脂質がインボルクリンに共有結合していないか、あるいは架橋反応が十分でなく抗原性を保持していることを意味し、角層試料におけるコーニファイドエンベロープは未熟な状態にあると評価できる。逆に、例えば、インボルクリンが有意には検出できない場合には、脂質のインボルクリンへの共有結合がかなり生じているか、あるいは架橋反応が十分に進み抗原性が消失しており、コーニファイドエンベロープは成熟した状態にあると評価できる。また、例えば、ナイルレッドで強陽性に染色されるコーニファイドエンベロープが角層試料中に検出（または観察）される場合には、コーニファイドエンベロープは強靱な状態であると評価できる。逆に、ナイルレッドによる染色性に多様性が認められる場合には、コーニファイドエンベロープ形成過程にばらつきがあると評価できる。以上の評価は培養した表皮角化細胞におけるコーニファイドエンベロープ形成過程にも同様に適用できる。

実施例

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。

実施例 1

ビオチンヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに5mMのビオチンヒドラジド（PIERCE社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、次にフルオレセイン標識アビジン（アマシャムファルマシアバイオテク社製；PBSにて1：100容量に希釈）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡（オリンパス社BX52）にて観察した。図1にその観察像を示す。

図1に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、ビオチンヒドラジド-フルオレセイン標識アビジンにより酸化タンパク質は十分に標識され、検出可能であることが示唆された。

実施例 2

テキサスレッドヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の顔面（頬）及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに20 μ Mのテキサスレッドヒドラジド（モレキュラープロブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図2にその観察像を示す。

図2に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、フルオレセイン-5-チオセミカルバジドと同様に酸化タンパク質はテキサスレッドヒドラジドによっても標識されることが明らかとなった。

実施例 3

ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）による角層酸化タンパク質の

検出

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに200 μ Mのジニトロフェニルヒドラジン（和光純薬工業（株）社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、次にウサギDN P抗体（ZYMED社製）のPBS溶液（1 μ g/ml）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄し、フルオレセイン標識抗ウサギIg（アマシャムファルマシアバイオテック社製；PBSにて1：100に希釈）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図3にその観察像を示す。

図3に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、ジニトロフェニルヒドラジンを用いても、ビオチンヒドラジド、フルオレセイン-5-チオセミカルバジドやテキサスレッドヒドラジドと同様に、酸化タンパク質を特異的に標識できることがわかった。

実施例 4

アセトン処理した角層の酸化タンパク質の評価

4人の健常人の顔面に透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取し、一人当たり三つの試料を用意した。一つの試料は30分アセトン処理を施し、他の二つの試料は処理を施さなかった（ここでアセトン処理した試料を「アセトン→標識」試料とし、他の二つは「標識のみ」又は「標識→アセトン」試料とする）。それぞれに20 μ Mのフルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝

生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、「標識→アセトン」試料のみアセトンで30分処理した。次いで、それぞれの試料について蛍光顕微鏡にて観察した。画像から背景と細胞を分離し、それぞれの平均輝度を求めることで酸化タンパク質の量を数値化した。図4にその数値化したグラフを示す。

図4から、テープ角層をアセトン処理してもシグナル強度に有意な変化が認められないことがわかった。従って、蛍光ヒドラジドが標識するカルボニル基は、大部分が酸化タンパク質由来であり、角層に存在する過酸化脂質の割合は小さいことが示唆された。

よって、本願発明は角層中の酸化タンパク質を検出するのに極めて有利であることが示唆された。

実施例 5

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる角層酸化タンパク質の部位差の検出

健常人の顔面（頬）及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに20 μ Mのフルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100m MのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。数値化し際には、画像から背景と細胞を分離し、それぞれの平均輝度を求めた。図5にその観察像と数値化したグラフを示す。

図5に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、観察像からも、数値化したグラフからも、頬、即ち、露光部における酸化タンパク質の量が、上腕内側、即ち非露光部よりも多いことが明らかであり、J. J. Thiele et al. FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406の見解と一致した。従って、ビオチンヒド

ラジドーフルオレセイン標識アビジンにより酸化タンパク質は十分に標識され、検出可能であることが明らかとなった。

実施例 6

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる角層最外層と内層の酸化タンパク質の検出

健常人の上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、これを20回繰り返して、角層最外層と20枚目の角層を採取した。これに20 μ Mのフルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。数値化し際には、画像から背景と細胞を分離し、それぞれの平均輝度を求めた。図6にその観察像と数値化したグラフを示す。

図6に示す通り、観察像からも、数値化したグラフからも、酸化タンパク質は最外層のほうに20枚目の角層よりも多く、従って酸化タンパク質は角層上層ほど多いことが認められ、J.J.Thiele et al. J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3), 335-359の所見と一致した。

実施例 7

紫外線照射による角層酸化タンパク質の増加

健常人の上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、UVA（240J/cm²）及びUVB（77J/cm²）照射した後に、20 μ Mのフルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図7にその観察像を示す。紫外線照射に

よる酸化タンパク質の増加が認められ、その結果はC. S. Sander et al. J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625のものと一致した。

実施例 8

紫外線照射による角層酸化タンパク質の増加

健常人の背中に 2 MED の UVB を照射してから 10 日後に、照射部位に透明な粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、20 μ M フルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブズ社製）の 100 mM MES-Na 緩衝液（pH 5.5）を室温にて 1 時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図 8 にその観察像と数値化したグラフを示す。照射前と比較して、紫外線照射による酸化タンパク質の増加が認められた。

実施例 9

次亜塩素酸ナトリウムと不飽和脂肪酸による角層酸化タンパク質の増加

健常人の腹部に、透明な粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、200 μ g/cm² の量の不飽和脂肪酸（リノール酸、オレイン酸、パルミトレイン酸）を塗布後、0.2 mM の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で 37 °C、18 時間インキュベートした。インキュベート終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、20 μ M フルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブズ社製）の 100 mM MES-Na 緩衝液（pH 5.5）を室温にて 1 時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図 9 にその観察

像と数値化したグラフを示す。水でインキュベートした場合と比較して、次亜塩素酸ナトリウムによるインキュベートでは酸化タンパク質の増加が認められた。また、不飽和脂肪酸を角層付着テープに塗布して次亜塩素酸ナトリウム中でインキュベートすることにより、酸化タンパク質の更なる増加が認められた。

実施例 10

次亜塩素酸ナトリウムによる角層酸化タンパク質の増加

健常人の前腕に 20 mM 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を 2 μ L / cm^2 の量で 5 日間連日塗布し、透明な粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、20 μ M フルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブズ社製）の 100 mM MES-Na 緩衝液（pH 5.5）を室温にて 1 時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図 10 にその観察像と数値化したグラフを示す。次亜塩素酸ナトリウム連日塗布による酸化タンパク質の増加が認められた。

実施例 11

不飽和脂肪酸による角層酸化タンパク質の増加

健常人の前腕に 30% リノール酸エタノール溶液を 40 μ L / cm^2 の量で 3 日間連日塗布し、透明な粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、20 μ M フルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブズ社製）の 100 mM MES-Na 緩衝液（pH 5.5）を室温にて 1 時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図 11 にその観察像と数値化したグラフを示す。リノール酸連日塗布による酸化タンパク質の増加が認められた。

実施例 1 2

アルデヒドによる角層酸化タンパク質の増加

健常人の腹部に、透明な粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、1 mM アクロレイン水溶液中で室温で18時間インキュベートした。インキュベート終了後にリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて十分に洗浄した後、20 μ M フルオレセイン-5-チオセミカルバジド (モレキュラープローブズ社製) の100 mM MES-Na緩衝液 (pH 5.5) を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図12にその観察像と数値化したグラフを示す。アクロレインによる酸化タンパク質の増加が認められた。

実施例 1 3

薬剤による角層酸化タンパク質の増加の抑制

健常人の腹部に、透明な粘着テープを貼付して直ちにはがし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、0.2 mM 次亜塩素酸ナトリウムと一定濃度の薬剤が混合した水溶液中で37℃、18時間インキュベートした。インキュベート終了後にリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて十分に洗浄した後、20 μ M フルオレセイン-5-チオセミカルバジド (モレキュラープローブズ社製) の100 mM MES-Na緩衝液 (pH 5.5) を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。薬剤により、次亜塩素酸ナトリウムによる酸化タンパク質の増加が抑制されることが示された。次亜塩素酸ナトリウムのみでインキュベートした時の値と水のみでインキュベートした時の値の中間値まで酸化タンパクの増加が抑制される各種薬剤の濃度を表1に示す。

表 1

	50% 抑制濃度 (μ M)
アスコルビン酸	210
α -トコフェロール	220
2-O- α -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸	190
3-O-エチルアスコルビン酸	140
2-アミノエタンスルフィン酸	86
グルタチオン	8
2-アミノエタンチオスルホン酸	63
α -トコフェロール-2-L-アスコルビン酸リン酸ジエステルカリウム塩	<125
アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩	<125
ピロ亜硫酸ナトリウム	<125

実施例 1 4

ビオチンヒドラジドによる酸化コーニファイドエンベロープの検出

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに5mMのビオチンヒドラジド（PIERCE社コーニファイドエンベロープ社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後に2%のドデシル硫酸ナトリウム、20mMのジチオスレイトール、5mMのEDTAを含む0.1Mのトリス塩酸塩緩衝液（pH8.5）を加えて100℃にて10分加熱した。不溶物を、4,000g、10分間の遠心分離により集めた。さらに溶出液添加と加熱を繰り返して、可溶性成分を徹底的に除去した。こうして得られた不溶物をコーニファイドエンベロープとした。コーニファイドエンベロープ浮遊液をスライド

ガラスに滴下し、風乾、アセトン固定の後、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて十分に洗浄し、次にフルオレセイン標識アビジン (アマシヤムファルマシアバイオテク社製 ; PBS にて 1 : 100 に希釈) を室温にて 1 時間反応させた。反応終了後に PBS にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図 1 3 にその観察像を示す。

図 1 3 より、酸化形態のコーニファイドエンベロープ (酸化コーニファイドエンベロープ) の検出が認められ、それは非露光部たる上腕内側よりも、露光部たる顔面の角層に多く存在することが認められた。

実施例 1 5

コーニファイドエンベロープの酸化度と成熟度との同時比較

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに 200 μ M のジニトロフェニルヒドラジン (和光純薬工業 (株) 社製) の 100 m M の MES-Na 緩衝液 (pH 5.5) を室温にて 1 時間反応させた。反応終了後に 2% のドデシル硫酸ナトリウム、20 m M のジチオスレイトール、5 m M の EDTA を含む 0.1 M のトリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.5) を加えて 100°C にて 10 分加熱した。不溶物を、4,000 g、10 分間の遠心分離により集めた。さらに溶出液添加と加熱を繰り返して、可溶性成分を徹底的に除去した。こうして得られた不溶物をコーニファイドエンベロープとした。コーニファイドエンベロープ浮遊液をスライドガラスに滴下し、風乾、アセトン固定の後、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて十分に洗浄した、次に、DNP 標識された酸化コーニファイドエンベロープを検出する目的でウサギ抗 DNP 抗体 (ZYMED 社製、1 μ g / ml) を、同時に未熟コーニファイドエンベロープを検出する目的でマウス抗ヒトインボルクリン抗体 (NOVOCASTRA 社製) を一次抗体として反応させた。余剰の抗体を洗浄により除去した後に、テキサス

レッド標識抗ウサギイムノグロブリン及びFITC標識抗マウスイムノグロブリン（各々アマシャムファルマシアバイオテク社製；PBSにて1：100に希釈）を二次抗体として室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

図14にその観察像を示す。

また、同様にしてDNP標識された酸化コーニファイドエンベロープを、ウサギ抗DNP抗体、FITC標識抗マウスイムノグロブリン抗体により検出するとともに、ナイルレッド染色により成熟コーニファイドエンベロープを染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。図15にその観察像を示す。この図において、ナイルレッドにより赤色に染色された成熟コーニファイドエンベロープは白三角で、FITCで黄緑色に染色された酸化形態のコーニファイドエンベロープ（酸化コーニファイドエンベロープ）は黒三角で示す。

図15より、酸化コーニファイドエンベロープは非露光部たる上腕内側よりも、露光部たる顔面の角層に多く存在することが認められた。

産業上の利用の可能性

本発明により、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を簡易に獲得し、特に化粧品等の販売の際のカウンセリングサービスにおけるかかる酸化タンパク質の情報の活用が図れる。

請 求 の 範 囲

1. 角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法。

2. 前記検出を蛍光顕微鏡下で行い、それにより得た検出結果を画像化する、請求項1記載の方法。

3. 前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項1又は2記載の方法。

4. 前記角層試料が皮膚に対するテープストリッピングにより採取されたテープ角層である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

5. 角層酸化タンパク質の角層上での存在を二次元的に評価する方法に利用するためのキットであって、

テープストリッピングにより角層試料を採取するための粘着テープ；及び

酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識するための蛍光物質；

を含んで成ることを特徴とするキット。

6. 前記評価が蛍光顕微鏡下で行われ、それにより得た検出結果が画像化される、請求項5記載のキット。

7. 前記蛍光物質がヒドラジノ基含有蛍光物質であり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項5又は6記載のキット。

8. 酸化タンパク質の増加を抑制する薬剤のスクリーニング方法であって、角層を適当な酸化剤及び候補薬剤で処理し、しかる後に角層上の酸化されたタンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで、当該薬剤の酸化タンパク質の増加を抑制する活性を評価することを特徴とする方法。

9. 前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項8記載の方法。

10. 皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法。

11. 前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項10記載の方法。

12. 更に、前記コーニファイドエンベロープの疎水性領域を選択的に染色できる色素で染色して検出する及び／又は当該コーニファイドエンベロープの抗原性を検出することを含んで成る、請求項10又は11記載の方法。

13. 前記抗原性が抗ヒトインボルクリン抗体を使用して検出される、請求項12記載の方法。

14. 前記検出を蛍光顕微鏡で行う、請求項9～13のいずれか1項記載の方法。

Fig.1

上腕内側

顔面

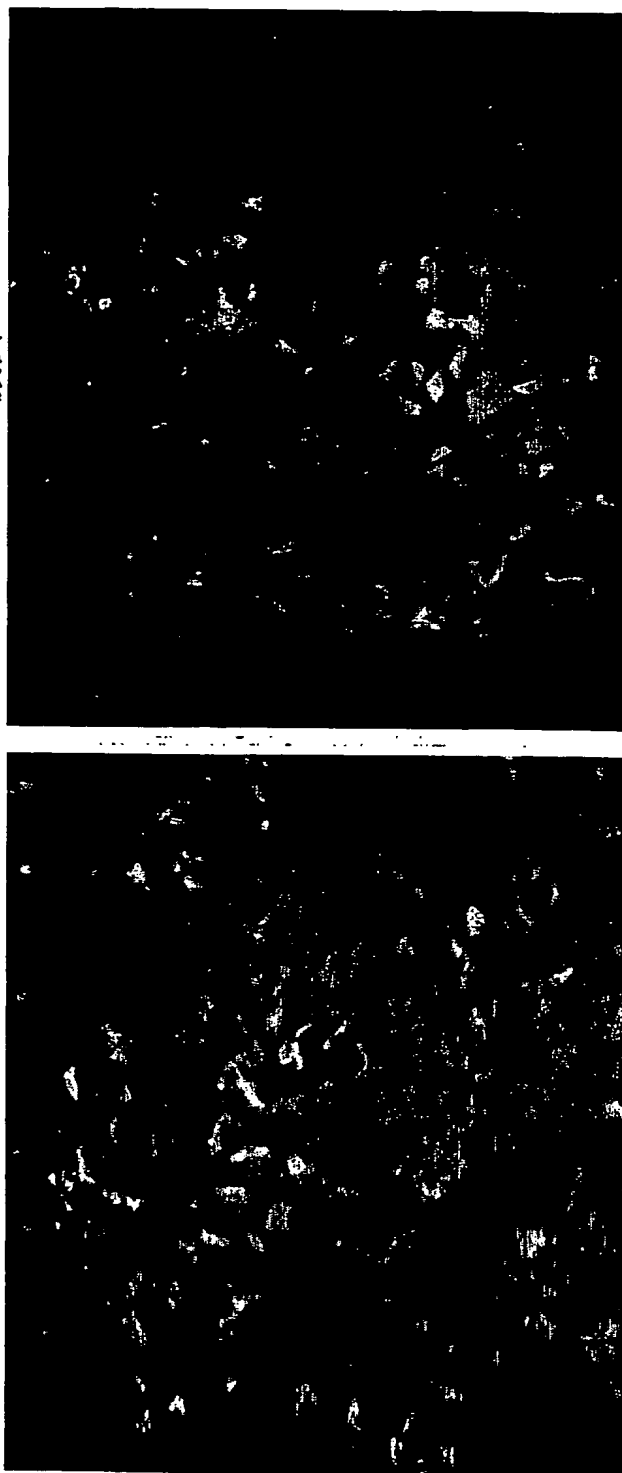
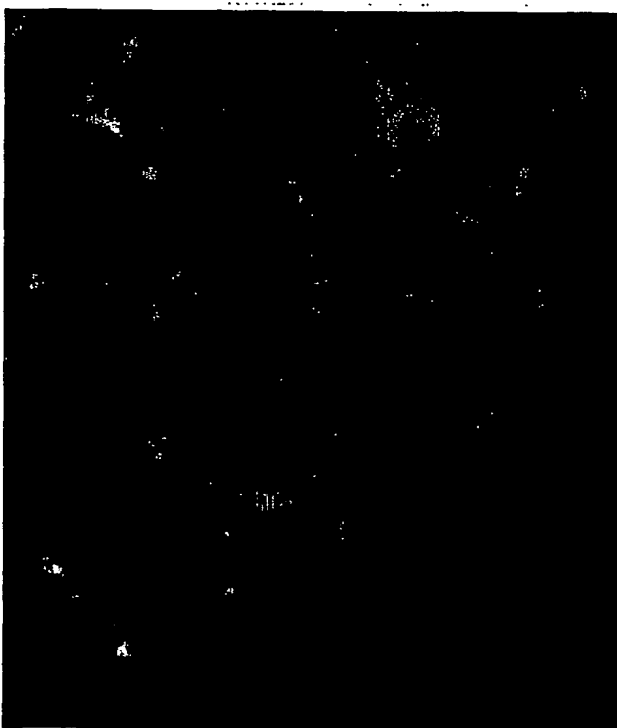


Fig.2

上腕内側



顔面

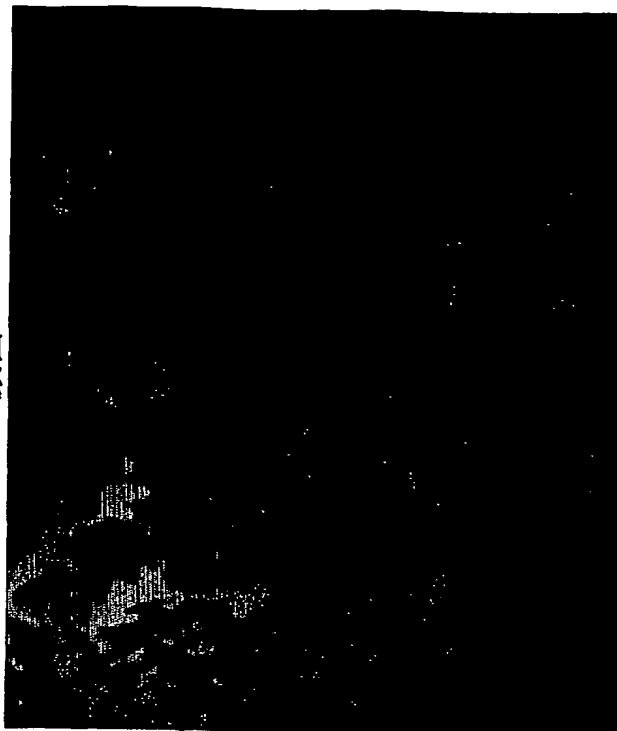


Fig.3

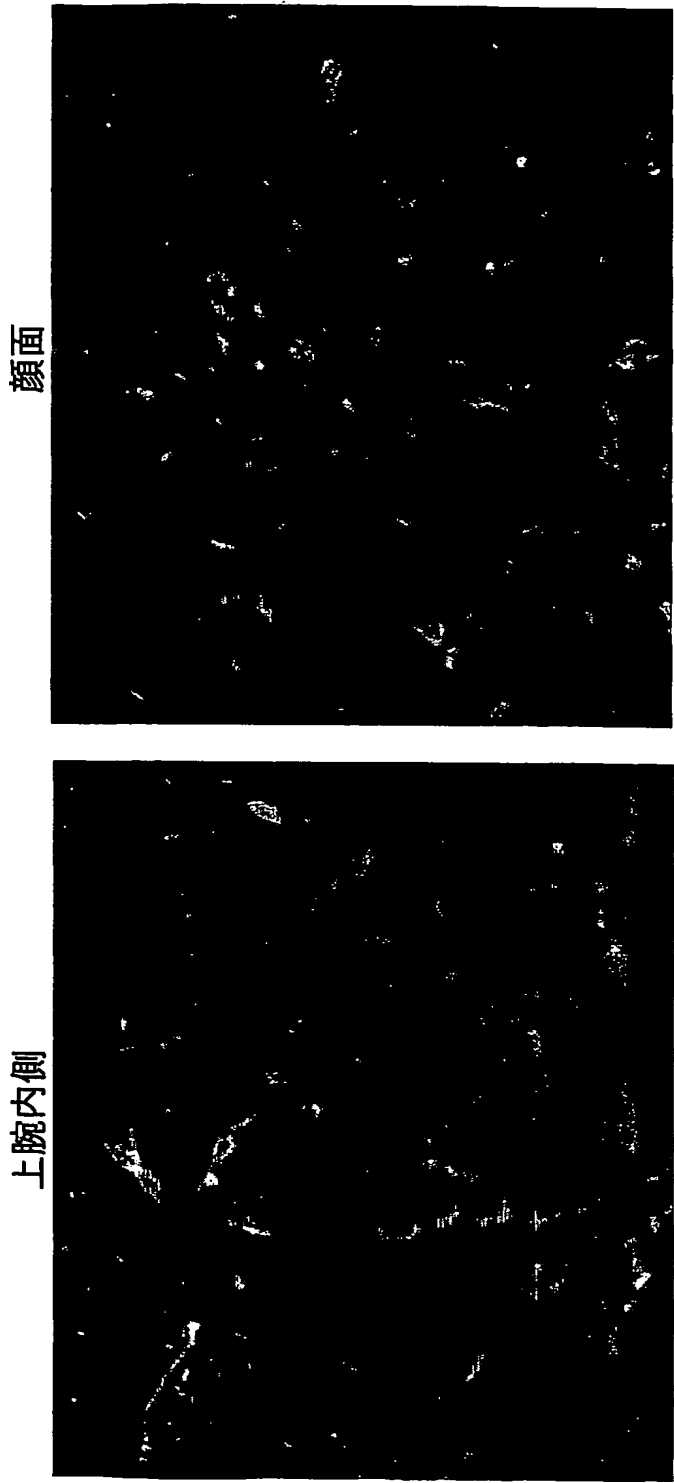


Fig.4

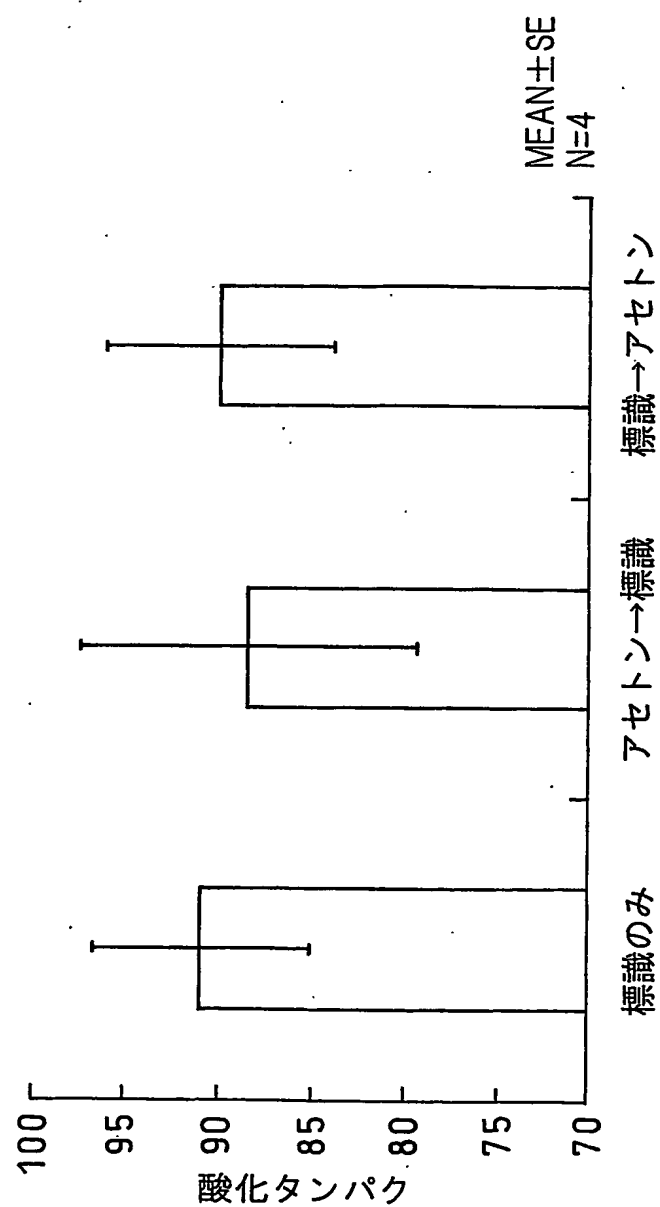


Fig.5

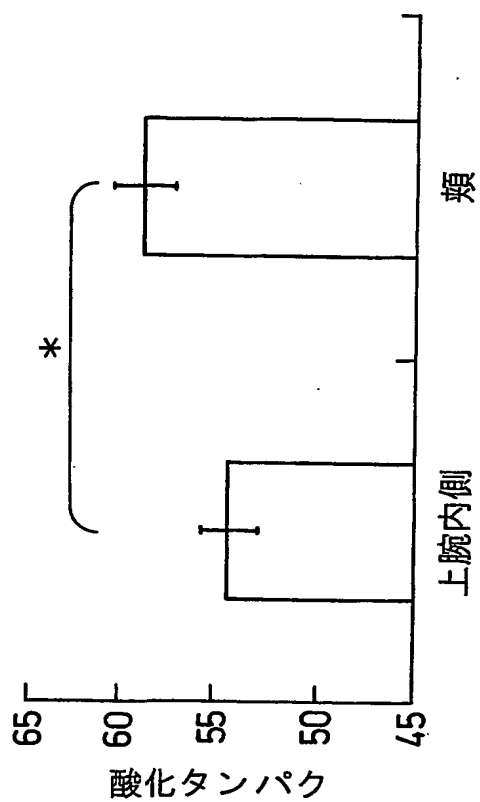
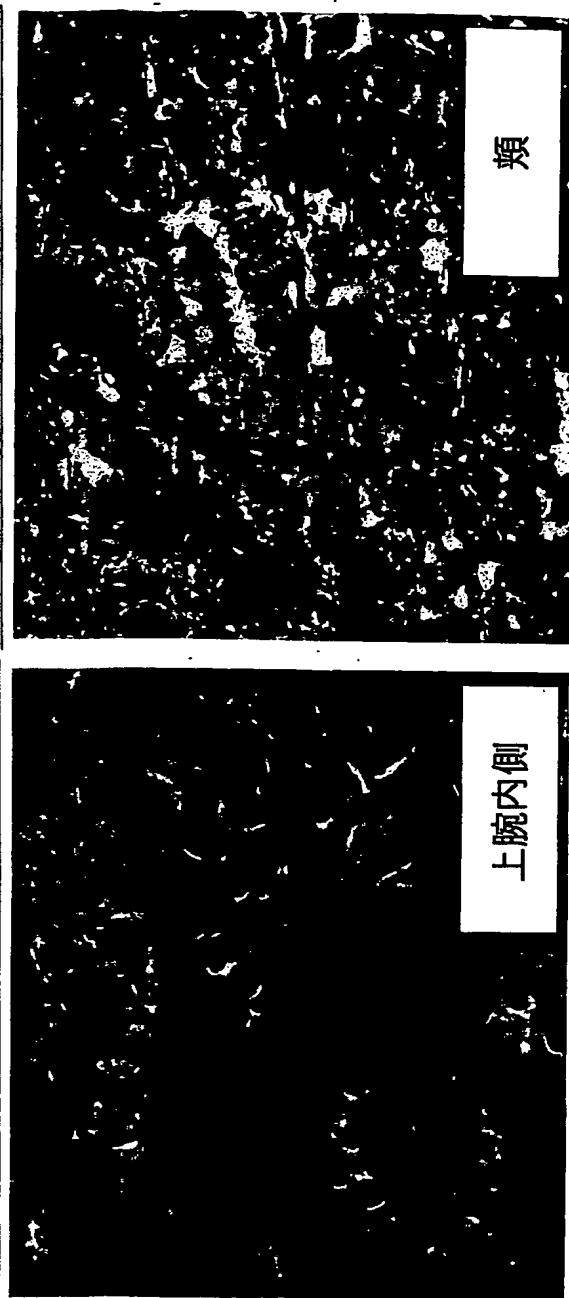


Fig.6

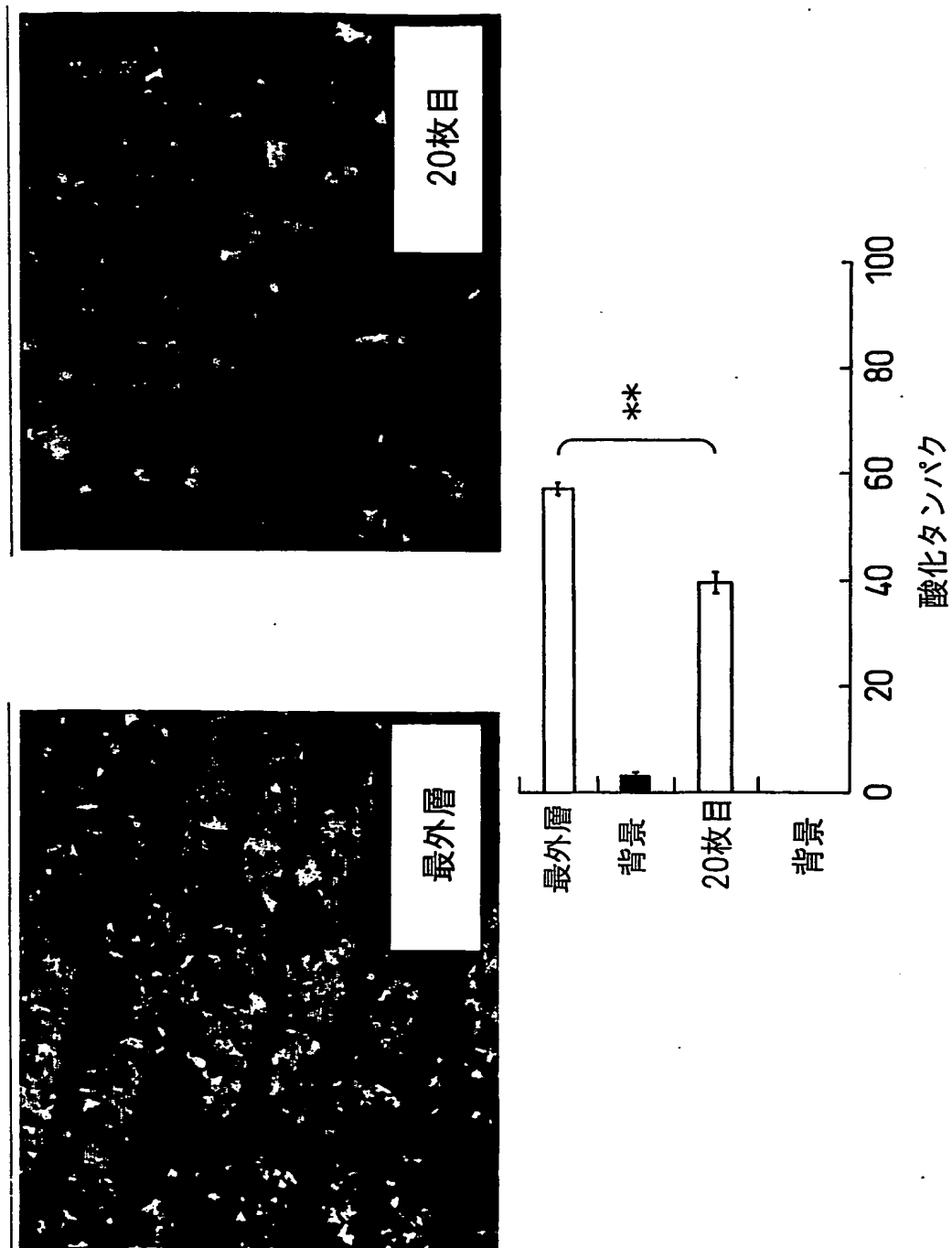


Fig.7

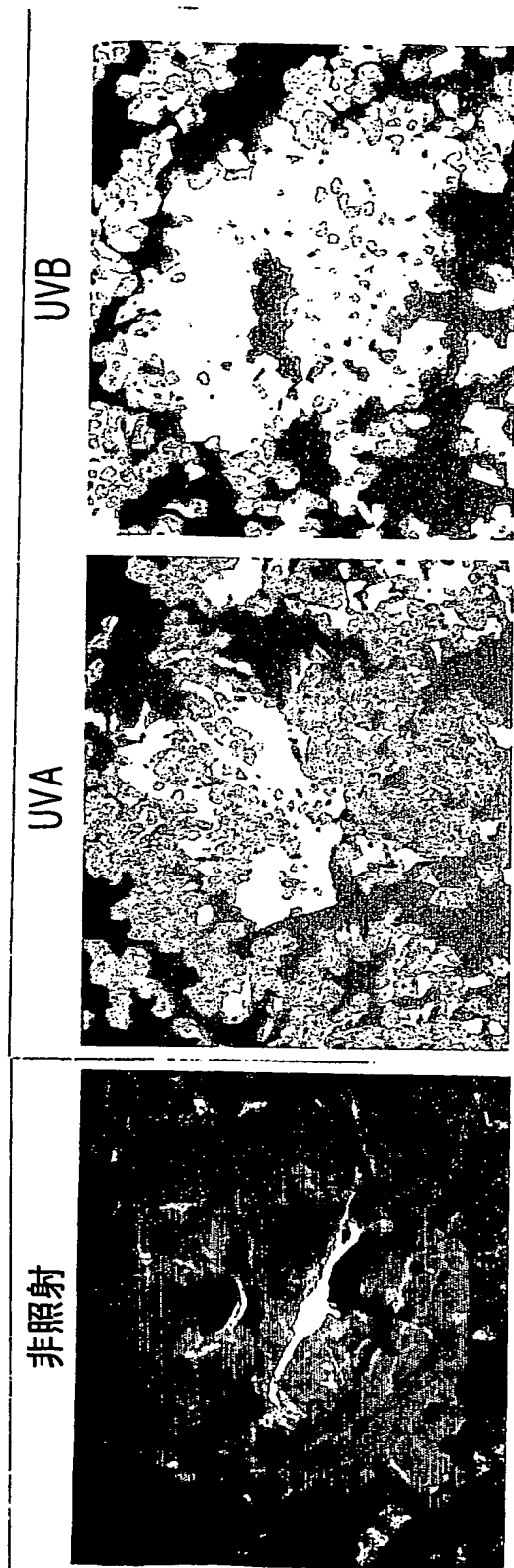


Fig.8

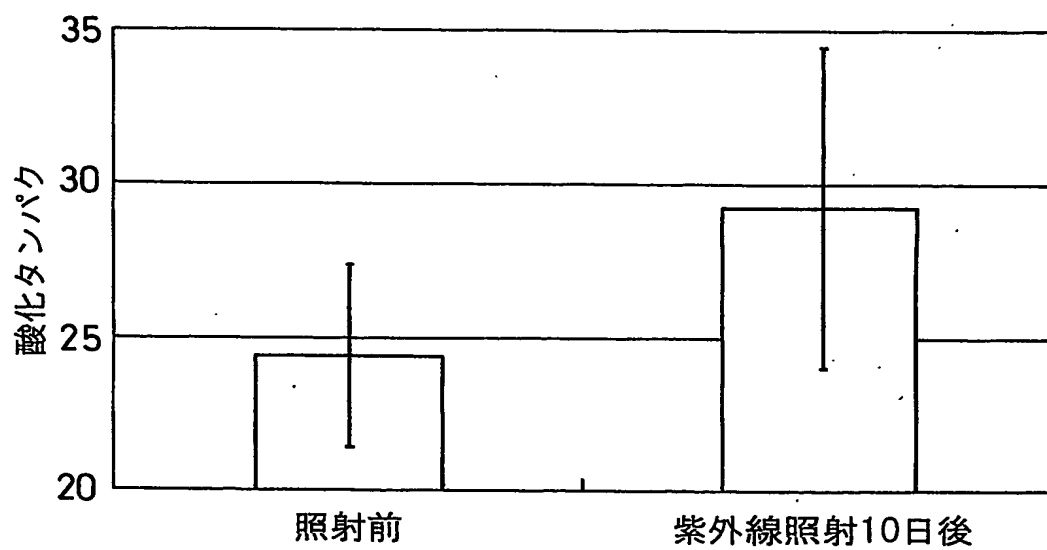
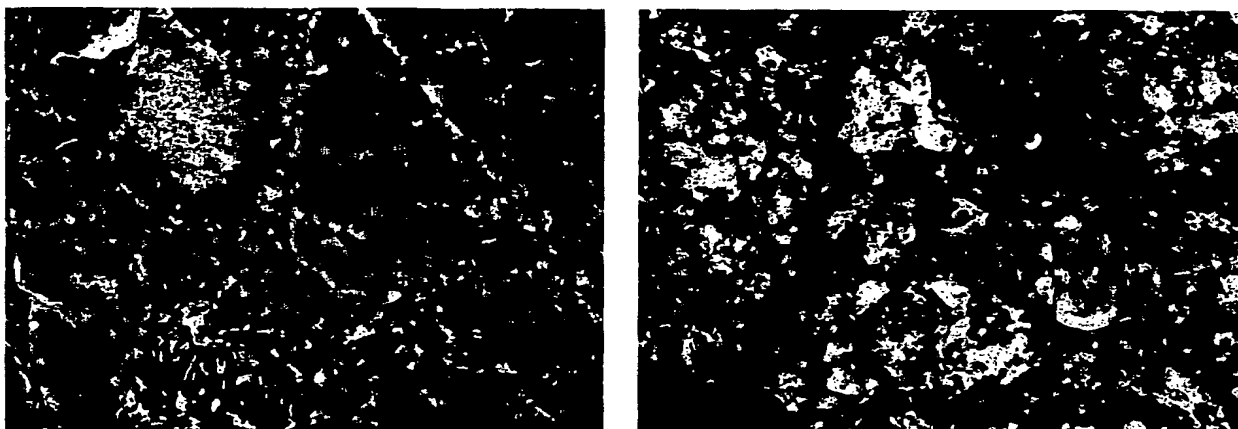


Fig.9

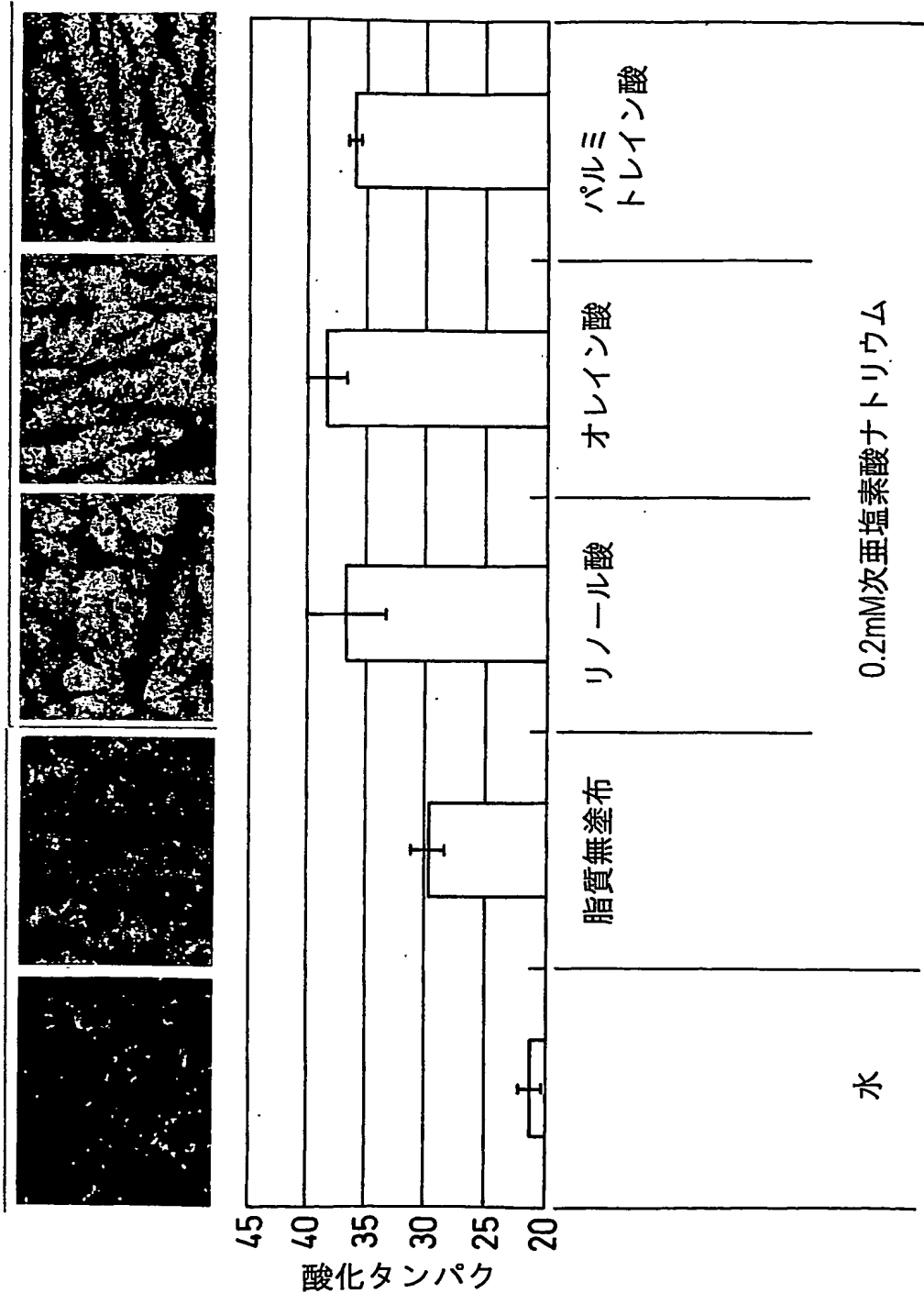


Fig.10

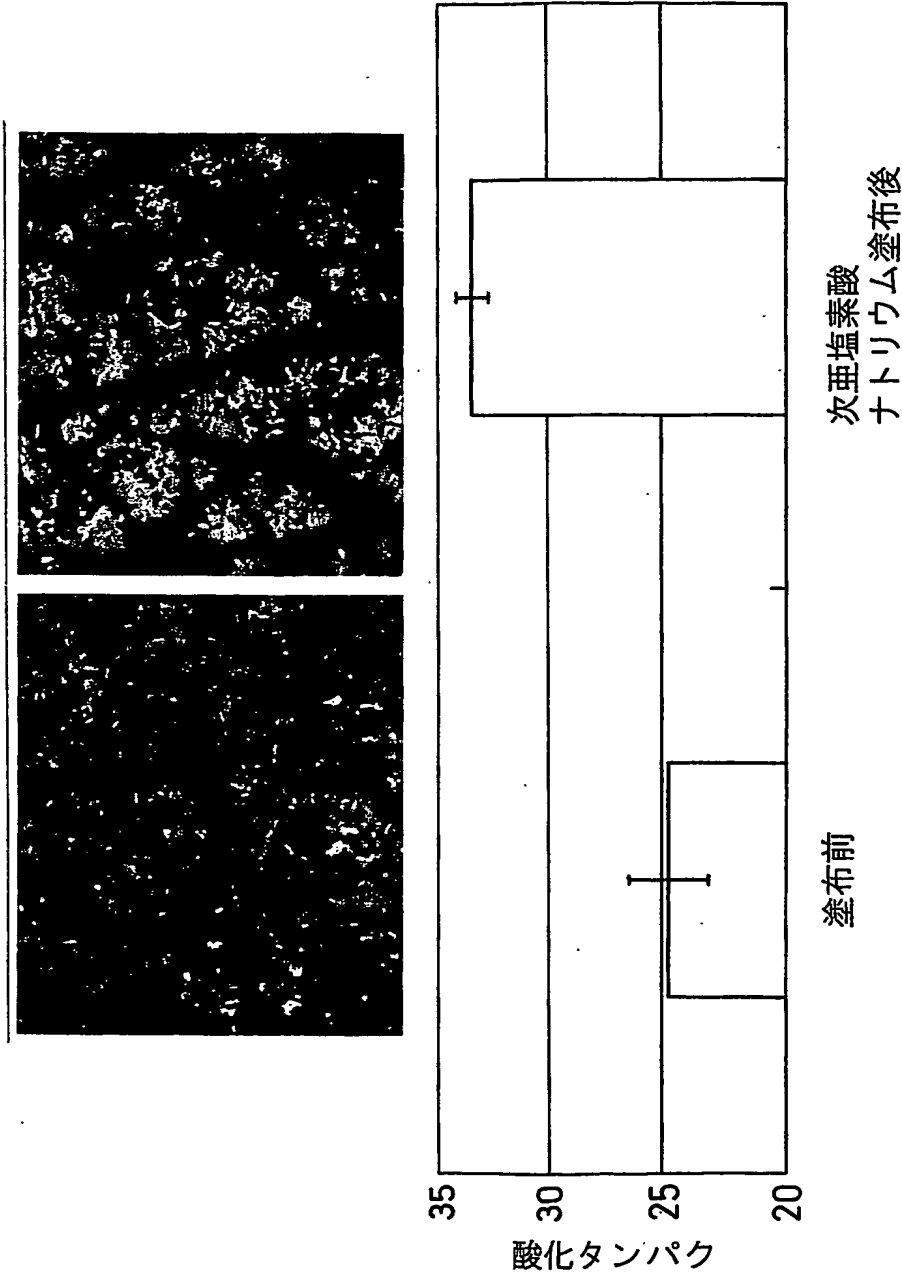


Fig.11

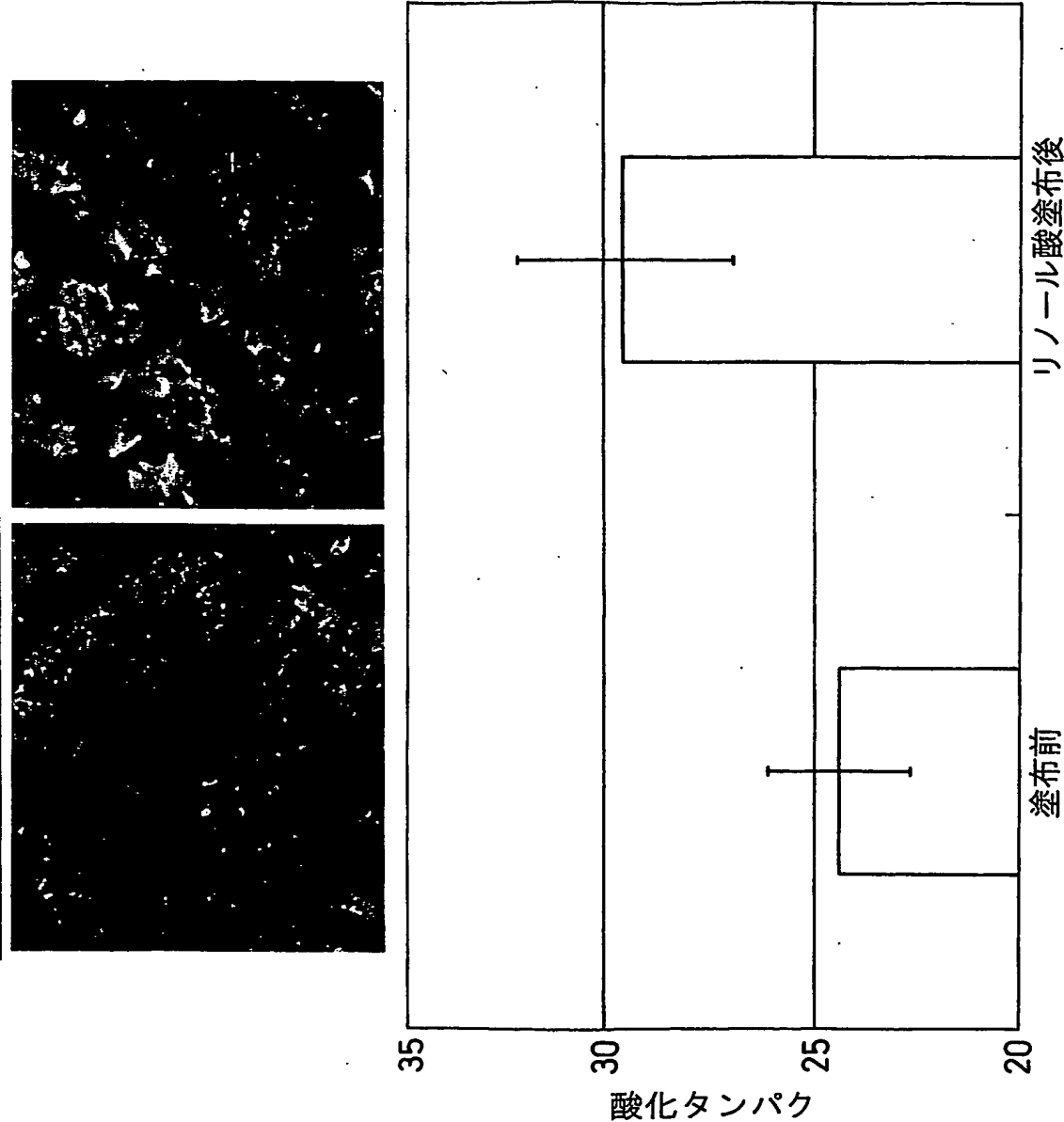


Fig.12

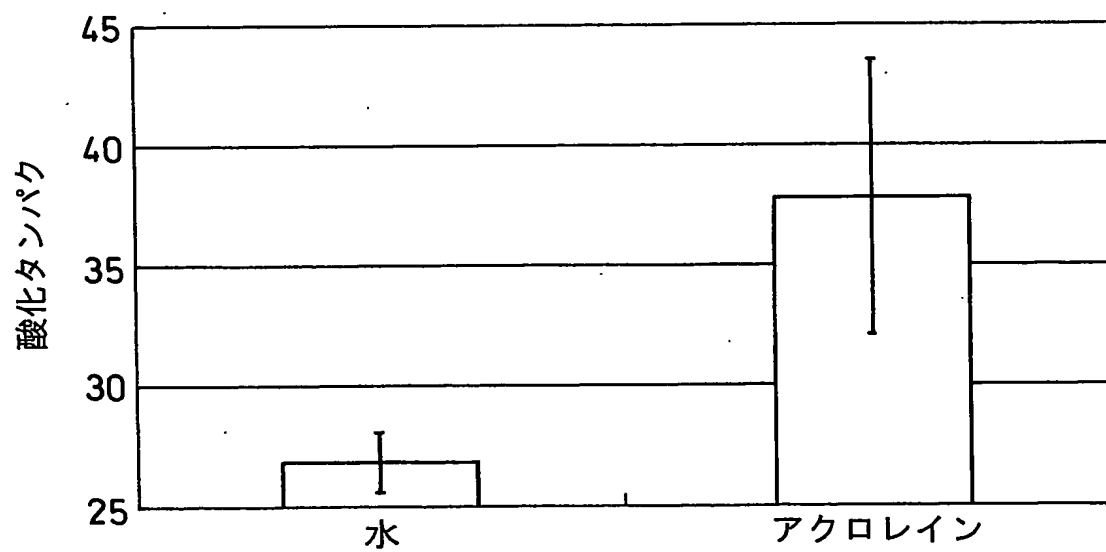
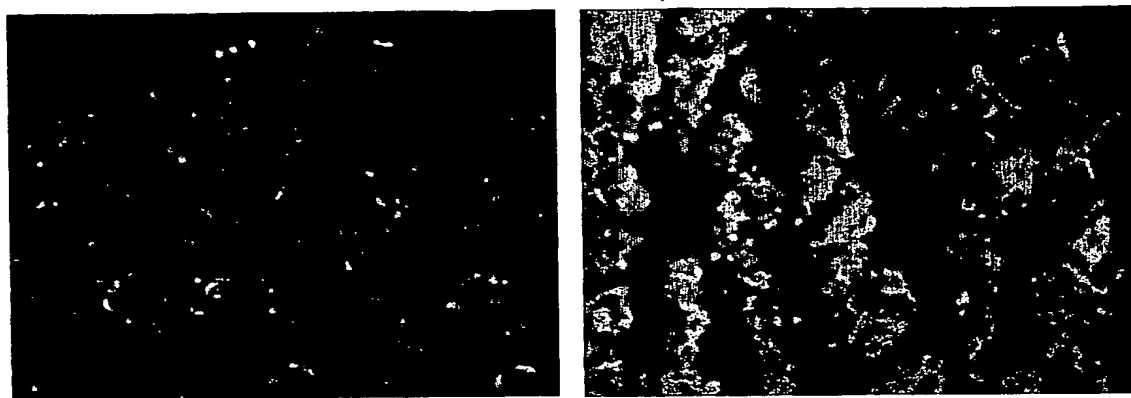


Fig.13

上腕内側



顔面

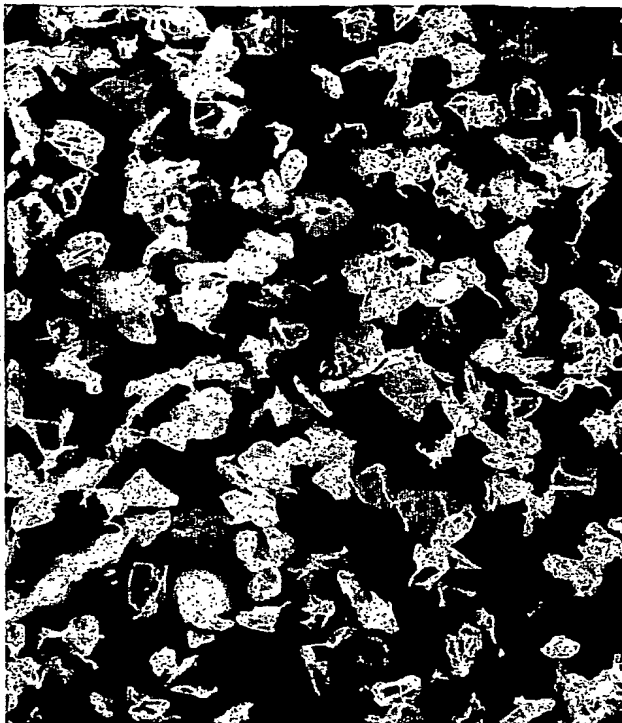


Fig.14

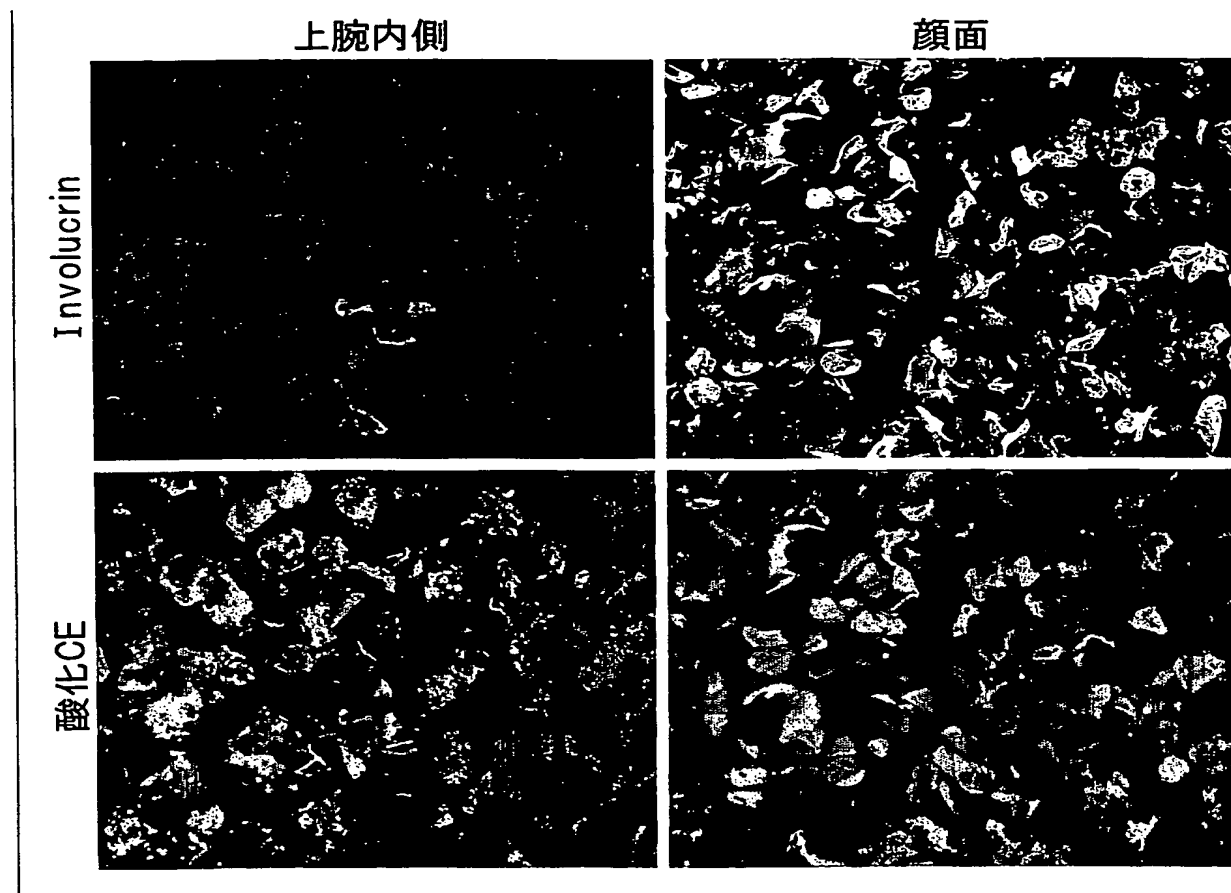
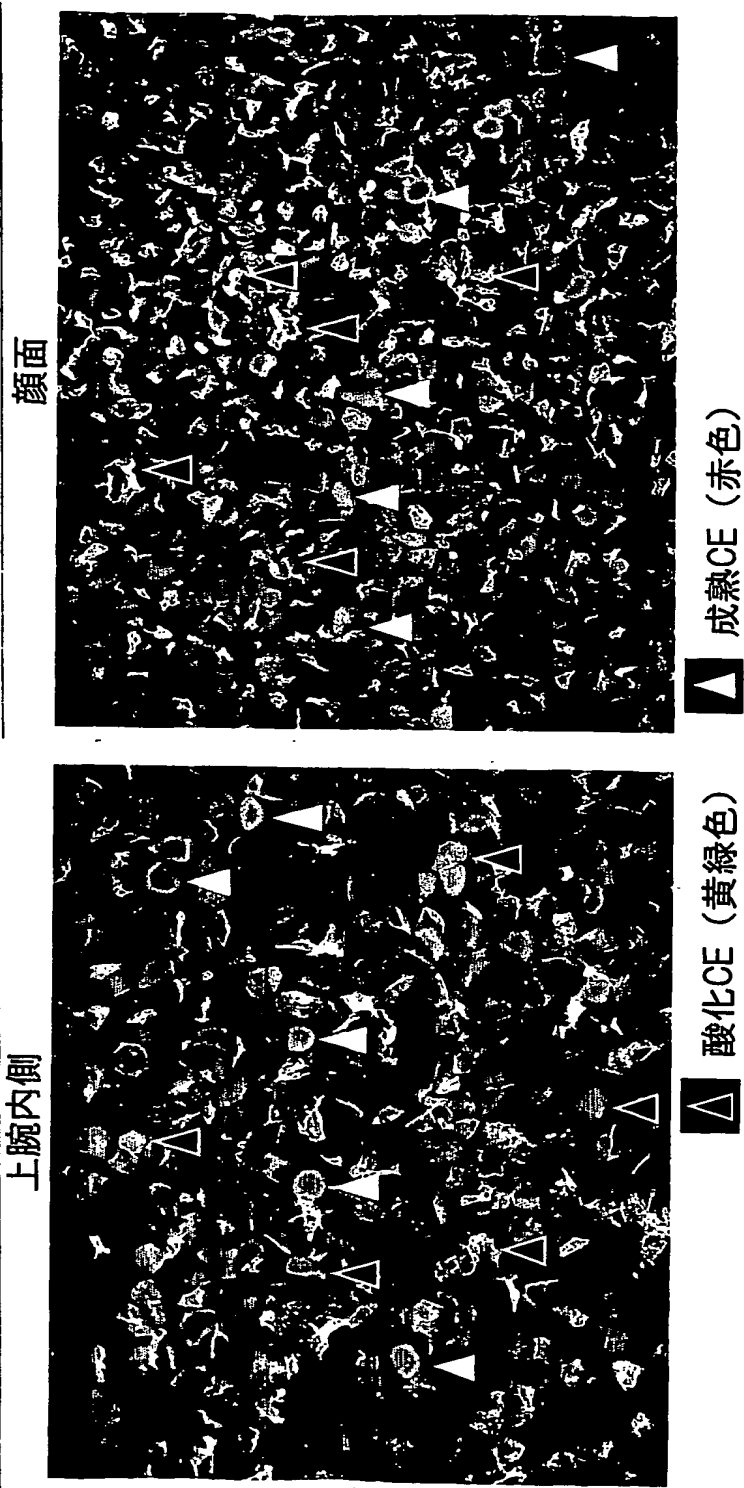


Fig.15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-125854 A (Pola Chemical Industries Inc.), 09 May, 2000 (09.05.00), (Family: none)	1-7
Y	JP 7-209292 A (Pola Chemical Industries Inc.), 11 August, 1995 (11.08.95), (Family: none)	1-7
Y	Christina S. Sander, Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo, Journal of Investigative Dermatology, Vol.118, No.4, pages 618 to 625, 2002	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July, 2004 (27.07.04)

Date of mailing of the international search report

10 August, 2004 (10.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005620

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 4 relate to a method of two-dimensionally evaluating the properties of an oxidized protein on the horny cell layer, while the inventions according to claims 5 to 7 relate to a kit to be used in this method. In contrast, the inventions according to claims 8 to 14 relate to a screening method or a method of detecting the oxidized state of cornified cell envelopes, not being a two-dimensional evaluation method.

As stated in "Background of the Invention" in the description of the present case, it has been a practice to detect and evaluate an oxidized protein on horny cell layer and, therefore, (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 7.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005620

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

cannot be considered as a novel problem.

Thus, it does not appear that the inventions according to claims 1 to 7 and the inventions according to claims 8 to 14 are so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 33/50 G01N 21/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 33/50 G01N 21/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-125854 A(ポーラ化成工業株式会社)2000.05.09 (ファミリー無し)	1-7
Y	JP 7-209292 A(ポーラ化成工業株式会社)1995.08.11 (ファミリー無し)	1-7
Y	Christina S. Sander, Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo, Journal of Investigative Dermatology, vol.118, no.4, p.618-625, 2002	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.07.2004

国際調査報告の発送日

10.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-4に係る発明は酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であり、請求の範囲5-7に係る発明は上記方法に用いられるキットである。これに対し、請求の範囲8-14に係る発明はスクリーニング方法又はコーニファイドエンベロープの酸化状態を検出する方法に係り、二次元的に評価するものではない。

角質上の酸化タンパク質を検出し評価することは、本願明細書の背景技術欄に示されるように、従来より行われていることであり、新規の課題ではない。

このため、請求の範囲1-7に係る発明と請求の範囲8-14に係る発明とは、単一の一般的発明概念を形成しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-7

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。